

CD44 LIGAND

Publication number: JP9025299 (A)

Publication date: 1997-01-28

Inventor(s): TANMACHI NORIKO; MIYASAKA MASAYUKI +

Applicant(s): SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES +

Classification:

~ International: **C07K14/78; C07K16/00; C07K16/28; C07K19/00; C12P21/02; G01N33/566; C12R1/91; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18; C07K19/00; C12P21/02; G01N33/566; (IPC1-7): C07K14/78; C07K16/28; C12P21/02; C12P21/02; C12R1/91; G01N33/566**

~ European:

Application number: JP19950200479 19950713

Priority number(s): JP19950200479 19950713

Abstract of JP 9025299 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new ligand, a glycoprotein having specific molecular weight with the sugar chain representing chondroitintetrasulfuric acid, having serine-glycine recurring unit, capable of activating cytotoxic T-cells via CD44, and useful for the research and prevention of cancer. **SOLUTION:** This new ligand is for protein CD44 lying on cell surface and has an important role concerning metastasis or lymphocyte homing and useful as e.g. a reagent for cancer research or a cancer preventive, having the following characteristics: a glycoprotein (proteoglycan) about 600,000 in molecular weight; the molecular weight of the protein portion (core protein) is about 18,000-22,000; the sugar chain represents chondroitintetrasulfuric acid; the amino acid sequence of the protein contains serine-glycine recurring units; capable of activating cytotoxic T-cells via CD44 borne by the T-cells; and capable of binding to the CD44 on a site differing from the binding site for the CD44 and hyaluronic acid. This new glycoprotein is obtained by purifying the supernatant resulted from culturing serglycin-productive cells through an anion exchange resin, gel filtration and a hydroxyapatite column.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-25299

(43)公開日 平成9年(1997)1月28日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/78	Z N A	8517-4H	C 0 7 K 14/78	Z N A
16/28		8517-4H	16/28	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	A
G 0 1 N 33/566			G 0 1 N 33/566	
// (C 1 2 P 21/02				

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-200479

(22)出願日 平成7年(1995)7月13日

特許法第30条第1項適用申請有り 1995年3月31日 T
h e A m e r i c a n S o c i e t y f o r B
i o c h e m i s t r y a n d M o l e c u l a r
B i o l o g y 発行の「T H E J o u r n a l o
f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 第
270巻第13号」に発表

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 反町 典子

東京都文京区本駒込3-18-22 東京都臨

床医学総合研究所内

(72)発明者 宮坂 昌之

東京都文京区本駒込3-18-22 東京都臨

床医学総合研究所内

(74)代理人 弁理士 西川 繁明

(54)【発明の名称】 C D 4 4 リ ガ ン ド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 癌の転移やリンパ球のホーミングに重要な役割を担う細胞表面タンパク質C D 4 4 のリガンドであつて、ヒアルロン酸ではない新規なC D 4 4 リガンド、その抗体、その製造方法、それを用いたC D 4 4 検出法を提供する。

【解決手段】 (1)分子量約60万の糖タンパク質(プロテオグリカン)、(2)タンパク質部分(コアタンパク質)の分子量約1.8万~約2.2万、(3)糖鎖がコンドロイチン4硫酸であり、(4)アミノ酸配列中にセリン-グリシン繰り返し構造を持ち、(5)細胞障害性T細胞をそれが持つC D 4 4 を介して活性化でき、(6)ヒアルロン酸との結合部位とは異なる部位でC D 4 4 と結合するC D 4 4 リガンド。セルグリシン産生細胞の培養上清中から陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を繰り返し、最終的にヒドロキシアパタイトカラムで精製する前記C D 4 4 リガンドの製造方法、それに対する抗体、そのコアタンパク質とそのコアタンパク質に対する抗体、前記C D 4 4 リガンドを蛍光色素、酵素または放射性同位元素で標識して使用するC

D 4 4 発現細胞または組織の検出法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 分子量約60万の糖タンパク質(プロテオグリカン)であり、(2) タンパク質部分(コアタンパク質)の分子量が約1.8万~約2.2万で、(3) 糖鎖がコンドロイチン4硫酸であり、(4) タンパク質のアミノ酸配列中にセリン-グリシンの繰り返し構造を持ち、(5) 細胞障害性T細胞を該T細胞が持つCD44を介して活性化することができ、(6) CD44とヒアルロン酸との結合部位とは異なる部位でCD44と結合することを特徴とするCD44リガンド。

【請求項2】 セルグリシン産生細胞の培養上清中から陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を繰り返し行い、最終的にハイドロキシアパタイトカラムで精製することを特徴とする請求項1記載のCD44リガンドの製造方法。

【請求項3】 細胞株がマウスCTL細胞株(CTL L-2)であることを特徴とする請求項2記載のCD44リガンド。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載のCD44リガンドのコアタンパク質。

【請求項5】 請求項1記載のCD44リガンドに対する抗体。

【請求項6】 請求項4記載のCD44リガンドのコアタンパク質に対する抗体。

【請求項7】 請求項1記載のCD44リガンドを蛍光色素、酵素または放射性同位元素で標識し、これをCD44発現細胞または組織の検出に使用することを特徴とするCD44検出法。

【請求項8】 請求項1記載のCD44リガンドに、まずビオチンを結合させ、得られた結合体をCD44発現細胞または組織と反応させた後、蛍光色素、酵素または放射性同位元素とアビシンまたはストレプトアビジンとの結合体と反応させる請求項7記載のCD44検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、CD44リガンドに関し、さらに詳しくは、癌の転移やリンパ球のホーミングに関し重要な役割を担う細胞表面タンパク質CD44のリガンドであって、ヒアルロン酸ではない新規なCD44リガンド、その抗体、CD44リガンドの製造方法、及び該CD44リガンドを用いたCD44検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】CD44(CD44分子)は、Pgp-1、Hermes抗原、ECMR IIIまたはIn(Lu)-related antigen等の名前で知られている膜貫通型の糖タンパク質である。CD44の分子構造は、N末端の軟骨リンクタンパク質に相同性のある部分、コンドロイチン硫酸が付加される部分(以上の2つの部分が細胞外部分)、膜貫通部位、及び細胞

内部分に大別される。CD44は、白血球、赤血球、線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞などの広範な細胞に発現が認められている。

【0003】CD44の機能は、極めて多彩である。例えば、間質細胞上のCD44は、ヒアルロン酸を結合し、その周囲にプロテオグリカン(proteoglycan)を集めることによって、マトリックスを構築することが示唆されている。また、リンパ球系の細胞では、CD44が細胞内情報伝達物質として働いている。その例としては、リンパ球系細胞表面のCD44分子に刺激を与えると、同種細胞凝集が誘導される。

【0004】細胞傷害性T細胞(CTL)においては、CD44からの刺激は、グランザイムの放出を誘導し、CTL活性を上昇させる。リンパ球-血管内皮細胞の反応では、CD44は、リンパ球がそれぞれに特定のリンパ組織に集まる(homing)ときの接着を担う、リンパ球表面分子であるホーミングレセプター(homing receptor)であると考えられている。また、CD44には、alternative splicingにより、多数のアイソフォームが存在するが、ある種のアイソフォームでは、癌細胞が転移する際に出現することが確かめられている。このように、CD44は、リンパ球の増殖、活性化などに重要な情報伝達分子であること、癌の転移にも直接関与し得る接着分子であることが知られている。

【0005】しかしながら、CD44のリンパ球ホーミングレセプターとしての機能には、いまだ不明な点が多い。これを調べるには、CD44の機能調節機構の解明が必要である。そのために、CD44が関与する各種現象において、CD44が認識するリガンドが何であるかについての探究が不可欠となっており、近年、その検索に関する研究が行われている。これまでにヒアルロン酸(hyaluronic acid)、コラーゲン、及びフィブロネクチンがCD44リガンドとして知られている。ヒアルロン酸は、CD44のN末端の軟骨リンクタンパク質に相同性のある部分でCD44と結合する。

【0006】末梢リンパ球をPMAなどで刺激すると、速やかにヒアルロン酸と結合するようになる。一方、前述のホーミングレセプターとしてのCD44が認識するリガンドは、ヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼ処理を行った後も、CD44と強い結合を示す。この結果は、リンパ球ホーミングレセプターとしてのヒアルロン酸以外の新しいCD44リガンドが存在することを示唆している。また、前述のようにCD44には多数のアイソフォームが存在し、アイソフォーム特異リガンドの存在も推定することができる。これらのCD44の未知のリガンドを得ることができるならば、免疫学や癌の基礎研究の試薬として有効である。さらに、癌の予防薬として使用できる可能性もある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、癌の転移やリンパ球のホーミングに関し重要な役割を担う細胞表面タンパク質CD44のリガンドであって、ヒアルロン酸ではない新規なCD44リガンドを提供することにある。本発明の他の目的は、このような新規なCD44リガンドの抗体、該CD44リガンドの製造方法、及び該CD44リガンドを用いたCD44検出法を提供することにある。さらに、CD44リガンドに対する抗体を用いれば、CD44リガンドを発現している組織等がはっきりになるとともに、リンパ球ホーミングの解析に有用である。また、癌においては、抗体がCD44リガンドをブロックしておくことで癌の予防や転移の抑制にもかかわってくる。本発明者らは、従来から知られているヒアルロン酸、ファイブロネクチン、及びコラーゲン以外に新しいCD44のリガンドがあるのではと考え、鋭意研究を行った結果、新規なCD44リガンドを見出した。

【0008】すなわち、CD44分子を発現していない細胞にCD44遺伝子を導入し、CD44を介した細胞間接着を誘導できるかどうか検討した。そして、細胞間接着を誘導できた細胞において、ヒアルロニダーゼ処理、ファイブロネクチン、コラーゲン添加等の処理をしても、接着が影響されない系を構築し、その細胞の培養上清及び細胞の表面分子から、CD44と結合する分子を抽出単離することにより新しいCD44リガンド分子を得た。この新規なCD44リガンドは、セリン-グリシンの繰り返し構造を持つセルグリシンにコンドロイチン4硫酸が多数結合した構造のプロテオグリカンである。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、(1)分子量約60万の糖タンパク質(プロテオグリカン)であり、(2)タンパク質部分(コアタンパク質)の分子量が約1.8万〜約2.2万で、(3)糖鎖がコンドロイチン4硫酸であり、(4)タンパク質のアミノ酸配列中にセリン-グリシンの繰り返し構造を持ち、(5)細胞障害性T細胞を該T細胞が持つCD44を介して活性化することができ、(6)CD44とヒアルロン酸との結合部位とは異なる部位でCD44と結合することができることを特徴とするCD44リガンドが提供される。

【0010】また、本発明によれば、セルグリシン産生細胞の培養上清中から陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を繰り返し行い、最終的にハイドロキシアパタイトカラムで精製することを特徴とする前記CD44リガンドの製造方法が提供される。さらに、本発明によれば、CD44リガンドの抗体、前記CD44リガンドを蛍光色素、酵素または放射性同位元素で標識し、これをCD44発現細胞または組織の検出に使用することを特徴とするCD44検出法が提供される。この検出法で

は、前記CD44リガンドに、まずビオチンを結合させ、得られた結合体をCD44発現細胞または組織と反応させた後、蛍光色素、酵素または放射性同位元素とアビジンまたはストレプトアビジンとの結合体と反応させることが好ましい。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳述する。CD44がどのような機構で調節を受けて、その機能が発現するのかを調べるためにCD44陰性マウスCTLL-2細胞を、CD44遺伝子(マウスCD44cDNA)を導入して、培養したところ、非常に強い細胞の凝集が認められた。次に、この凝集がCD44遺伝子を細胞に導入したことに起因するものであるか否かを調べるために、この系に抗CD44抗体を共存させてCD44が機能しないようにして培養実験を行ったところ、細胞の凝集が完全に阻害された。したがって、この凝集は、CD44を介した現象であると推定された。一方、このときのCD44と結合している分子が何であるかについて調べるために、CD44遺伝子を導入したCTLL-2細胞(トランスフェクタント)にヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)を作用させたが、細胞の凝集は、まったく影響を受けなかった。したがって、細胞の凝集は、ヒアルロン酸とCD44との結合によるものではないことが判明した。

【0012】このような実験結果から、ヒアルロン酸ではないCD44リガンドが関与していることが明らかになった。CD44の細胞外領域と免疫グロブリンの定常領域とを連結して作成した可溶性CD44(CD44-Ig)をプローブとして、CD44リガンドの検索を行ったところ、CTLL-2及びトランスフェクタントの細胞表面には、CD44リガンドは検出されなかった。そこで、CTLL-2及びトランスフェクタントを³⁵S-メチオニンで標識し、その培養上清を用いてCD44-Igで免疫沈降を行ったところ、CD44-Igに特異的に免疫沈降される高分子量のタンパク質が認められた。これらの実験結果から、上記の培養上清にCD44リガンドが存在することが明らかになった。

【0013】そこで、CTLL-2細胞の培養上清から、CD44と結合しうる物質の精製を試みた。具体的には、CTLL-2細胞の培養上清から、4M尿素を含む緩衝液を用いたイオン交換クロマトグラフィー、6M Guanidiniumを含む0.1%CHAPS緩衝液を用いたゲル濾過、4M尿素を含む緩衝液を用いたハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いて精製した。得られた精製品を種々の糖鎖切断酵素で処理したところ、コンドロイチナーゼ処理によりCD44を介した細胞の凝集が完全に消失した。したがって、CD44リガンドは、糖鎖としてコンドロイチン4硫酸を持つ糖タンパク質(プロテオグリカン)であることがわかった。その分子量は、糖鎖のないコアタンパク質が約18〜約22kd

(約1.8万〜約2.2万)であり、糖鎖が付加されれば約600kd(約60万)であることがSDS-PAGE電気泳動によりわかった。

【0014】CD44リガンドのタンパク質部分について、ペプチドシーケンサーで処理したところ、アミノ酸分析の結果は、CD44リガンドのコアタンパク質のN末端は、DDYGS GSGSGSGSGである。このコアタンパク質は、セリン-グリシンの繰り返し構造からなるセルグリシン(serglycin)の一種である。つまり、このCD44リガンドは、コンドロイチン4硫酸の糖鎖がついたセルグリシンである。また、本発明のCD44リガンドは、実施例4に示すように、ヒアルロン酸に比べ有意に細胞障害性T細胞のグランザイム放出を増強し、該T細胞を活性化させるものである。このことから、本発明のCD44リガンドは、ヒアルロン酸とは異なる機能を媒介し得るCD44リガンドであると言える。

【0015】後記の実施例の実験結果から明らかなように、本発明のCD44リガンドは、(1)分子量約60万の糖タンパク質(プロテオグリカン)であり、(2)タンパク質部分(コアタンパク質)の分子量が約1.8万〜約2.2万であり、(3)糖鎖がコンドロイチン4硫酸であり、(4)タンパク質のアミノ酸配列中にセリン-グリシンの繰り返し構造を持ち、(5)細胞障害性T細胞を該T細胞が持つCD44を介して活性化することができ、そして、(6)CD44とヒアルロン酸との結合部位とは異なる部位で結合する新規なCD44リガンドである。

【0016】本発明のCD44リガンドは、マウスCTL細胞株(CTL-2)の培養上清中から陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過を繰り返し行い、最終的にハイドロキシアパタイトカラムで精製することにより精製品として得ることができる。本発明のCD44リガンドを蛍光色素、酵素または放射性同位元素で標識すれば、これをCD44発現細胞または組織の検出に使用することができる。この場合、CD44リガンドに、まずビオチンを結合させ、得られた結合体をCD44発現細胞または組織と反応させた後、蛍光色素、酵素または放射性同位元素とアビシンまたはストレプトアビジンとの結合体と反応させる方法が好ましい。

【0017】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0018】[実施例1]

CD44リガンドの精製

(1) CTL-2の大量培養

CTL-2は、無血清培地EX-cell 300TM(JRH Bioscience製)を用いて培養した。培養には、IL-2を1nM培養液中に加え、ソフトセルバック(積水化学製)600ml用に1リットル

の培地を入れ、合計6リットル培養した。

(2) 濃縮

細胞培養後、5000gで20分間遠心分離を行い、培養上清を回収した。この培養上清を、MinitanTM system(分子量30,000カット、ミリボア製)を用いて、450mlに濃縮した。この濃縮液を、8M尿素、40mMトリス(pH8.0)と0.4M NaCl 450mlにて2倍に希釈した。その後、さらにMinitanTM systemにて450mlに再濃縮した。

(3) イオン交換クロマトグラフィー

前記(2)で濃縮した液をイオン交換クロマトグラフィーにて精製した。TSKG-DEAE(東ソー製)のゲルを用い、1ml/minの流速で、NaClの0.2Mから1.0Mの直線グラジエントで精製した。緩衝液は、4M尿素、20mMトリス(pH8.0)、0.2M NaClから1.0M NaClで行った。0.5MのNaClで溶出した画分を回収し、蒸留水で透析した。その後、セントリプレッサー30(アミコン製)にて濃縮した。

【0019】(4) ゲル濾過

前記(3)で精製し、濃縮した液を、6Mグアニジン、20mMトリス(pH8.0)、0.1%CHAPS緩衝液に置換後、TSKG-3000カラムを用いて、0.5ml/minの流速にてゲル濾過した。その後、ボイドボリュームのフラクションを回収した。これを蒸留水で透析後、6Mグアニジン、20mMトリス(pH8.0)、0.1%CHAPS緩衝液で、TSKG-3000カラムで0.5ml/minの流速にてゲル濾過した。再びボイドのフラクションを回収後、10mMのリン酸緩衝液にて透析した。

(5) ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー

前記(4)で回収した液をハイドロキシアパタイトカラムでクロマトグラフィーを行った。非吸着の部分を回収し、蒸留水にて透析後、4M尿素、20mMトリス(pH8.0)、0.2M NaClの液に置換した。

(6) イオン交換クロマトグラフィー

前記(5)で回収した液を再び(3)で実施した内容と同様の操作を行った。0.5M NaClで溶出される画分(フラクション)を回収後、蒸留水で透析し、凍結乾燥した。こうして得られたCD44リガンドの収量は、1.2mgであった。

【0020】[実施例2]

CD44リガンドの同定

(1) アミノ酸分析

精製したCD44リガンドをコンドロイチナーゼABC 20μg/mlで処理後、475A-ガスフェイズ・プロテインシーケンサー(ABI製)にてN末端を調べた。その結果、CD44リガンドのN末端がDDYGS GSGSGSGSGであることがわかり、セルグリシン

の一種であることが同定された。

CD44リガンドのN末端：Asp-Asp-Tyr-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (すなわち、DYGSGSGSGSGSG)

(2) 糖鎖の分析

精製したCD44リガンドを(1)と同様にコンドロイチナーゼABC処理した後、HPLCにてオリゴ糖の分析を行った。その結果、コンドロイチン4硫酸であることがわかった。

(3) 分子量の測定

精製したCD44リガンドを、酵素処理前後で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。その結果、CD44リガンドは、分子量約60万で、そのコアタンパク質の分子量が約18～約22kdであることが判明した。すなわち、得られたCD44リガンドは、分子量約1.8～約2.2万のコアタンパク質と糖鎖がコンドロイチン4硫酸からなる分子量約60万の糖タンパク質(ただし、プロテオグリカン)であった。

【0021】[実施例3]

CD44リガンドのCD44結合におけるコンドロイチン4硫酸の重要性

CD44リガンドを、コンドロイチナーゼABC処理の有無で、CD44との反応性を調べた。精製したCD44リガンド、該リガンドをコンドロイチナーゼABC処理した物及び該リガンドのコアタンパク質をそれぞれC

D44を発現しているBW5147の培養液中に添加したところ、精製したCD44リガンドを添加した場合にのみ細胞の凝集が認められ、コンドロイチナーゼ処理物では細胞の凝集が起らなかった。また、標準品のコンドロイチン4硫酸のみでも、BW5147は凝集しない。したがって、コンドロイチン4硫酸がセルグリシンのコアタンパク質に結合した立体構造が細胞の凝集のために重要であることが判明した。

【0022】[実施例4]

新しいCD44リガンドの細胞傷害性T細胞の活性化
細胞障害性T細胞 2×10^5 個を抗CD3抗体 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ でコートした。これを96well培養プレートに入れ、そして、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒアルロン酸と $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCD44リガンドを入れた培地10%FCS・RPMI1640 $200 \mu\text{l}/\text{well}$ にて培養した。37℃で3時間培養した後、培養上清 $20 \mu\text{l}$ について、グランザイムの一種であるセリンエステラーゼの放出を調べた。また、対象として、CD44リガンドを入れず、ヒアルロン酸のみを加えた培地でも同様に培養した。その結果、CD44リガンドを加えることにより、セリンエステラーゼの放出が増強されることが認められた(表1)。したがって、CD44リガンドが細胞障害性T細胞を該T細胞が持つCD44を介して活性化することができることがわかった。

【0023】

【表1】

	ヒアルロン酸、 CD44 リカンド ともになし	ヒアルロン酸 のみ添加	ヒアルロン酸、 CD44 リカンド ともに添加
放出量(*1) (%)	23	28	42

(*1) 放出量は、細胞中に含まれるセリンエステラーゼ全量を100%とする。

【0024】

【発明の効果】本発明の新しいCD44リガンドは、例えば、免疫学や癌の基礎研究の試薬として有効である。

また、このCD44リガンドは、細胞障害性T細胞を活性化することから、免疫増強剤としての期待がもてる。さらには、CD44が癌の転移に関わることから、新規CD44リガンドは、癌転移の予防薬としての有用性が期待される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所